

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian True Eksperimental (*true experiment design*) laboratorium dengan menggunakan rancangan *post test only control group design*.

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Institut Biosains Universitas Brawijaya Malang pada bulan Desember 2019 - Januari 2020.

4.3 Populasi dan Sample Penelitian

4.3.1 Populasi

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini menggunakan tikus putih (*Rattus norvegicus strain wistar*).

4.3.2 Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini menggunakan tikus putih (*Rattus norvegicus strain wistar*) yang memenuhi kriteria inklusi.

4.3.3 Besar sampel

Penelitian yang akan dilakukan akan menggunakan 5 kelompok perlakuan yaitu 1 kelompok kontrol negatif (-) (tidak diberi paparan asap rokok dan ekstrak) 1 kelompok kontrol positif (+) (hanya diberikan paparan asap rokok) dan yang 3 kelompok perlakuan (diberikan paparan asap rokok + Ekstrak kulit buah Naga Merah [*Hylocereus polyrhizus*] dengan dosis yang bertingkat), dan untuk menentukan jumlah tikus yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah berdasar rumus sebagai berikut :

Rumus Arifin dan Zahiruddin

$$DF = N - k = kn - k = k(n - 1)$$

$$n = DF/k + 1$$

N = jumlah total sampel

k = jumlah perlakuan

n = jumlah sampel perkelompok

DF di ganti dengan minimal 10 dan maksimal 20

$$\text{Mininal } n = 10/k + 1$$

$$\text{Maksimal } n = 20/k + 1$$

$$\text{Minimal } n = 10/5 + 1 = 3 = 3 \text{ ekor / kelompok}$$

$$\text{Maksimal } n = 20/5 + 1 = 5 = 5 \text{ ekor / kelompok}$$

Ukuran besar sampel adalah

$$\text{Minimal } N = \text{Minimal } n \times 5 = 3 \times 5 = 15$$

$$\text{Maksimal } N = \text{Maksimal } n \times 5 = 5 \times 5 = 25$$

Jadi besar sample hewan yang digunakan dalam penelitian ini 3 – 5 ekor perkelompok, dengan kata lain jumlah tikus yang digunakan berjumlah 15 – 25 ekor (Arifin dan Zahiruddin, 2017).

Setelah menggunakan Rumus “*Sample Size Calculation in Animal Studies Using Resource Equation Approach*” di dapatkan tikus yang akan digunakan dalam penelitian ini sebanyak 15 ekor yang dibutuhkan dan akan dibagi dalam 5 kelompok perlakuan setiap kelompok terdapat 3 tikus. Tikus cadangan tersebut diberi perlakuan yang sama dan tikus akan dilepas pada akhir penelitian jika pada saat akhir penelitian tidak terdapat tikus lain yang masuk kriteria drop out.

4.3.4 Teknik pengambilan sampel

Teknik pengambilan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Purposive Sampling*.

4.3.5 Karakteristik sampel penelitian

1) Kriteria Inklusi

- a) Tikus putih jantan (*Rattus norvegicus strain wistar*).
- b) Kondisi tikus dalam keadaan baik dan sehat yang ditandai dengan gerakan yang aktif (nocturnal), bulu yang tebal, dan mata yang jernih.
- c) Berat tikus 150 – 200 Gram
- d) Usia tikus 2 – 3 Bulan

2) Kriteria Drop Out

- a) Dalam proses penelitian terdapat tikus yang mati
- b) Tikus yang mengalami sakit pada proses penelitian, yang ditandai dengan gerakan tidak aktif, tidak mau makan atau minum, diare/feses lunak, dan serta rambut kusam dan rontok (Koolhas, 2010)

4.3.6 Variabel penelitian

1) Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah Ekstrak kulit buah Naga Merah (*Hylocereus polyrhizus*).

2) Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah Diameter Lumen Trakea pada tikus putih jantan (*Rattus norvegicus strain wistar*).

4.3.7 Definisi operasional variabel

1. Ekstrak kulit buah Naga Merah (*Hylocereus polyrhizus*) :

Ekstrak kulit buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*) bisa di dapatkan dari UPT Materia Medica Kota Batu, yang di buat dalam bentuk ekstrak secara maserasi kinetik menggunakan pelarut etanol 80% sehingga mendapatkan ekstrak etanol kulit buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*). Ekstrak kulit buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*) diberikan dalam dosis P1 = 100mg/200g BB tikus/hari, P2 = 200mg/200g BB tikus/hari, P = 400mg/200g BB tikus/hari pemberian dilakukan 1x sehari. Menggunakan skala ordinal yaitu kelompok :

- 1) Control Negative (K-)
- 2) Control Positif (K+)
- 3) Perlakuan 1 (P1)
- 4) Perlakuan 2 (P2)
- 5) Perlakuan 3 (P3)

2. Gambaran Diameter Lumen Trakea

Diameter lumen trakea di ukur dalam 1 lapang pandang dengan satuan μm cara pengukuran dengan 2 sisi garis secara vertikal dan horizontal dan hasil di rata-ratakan, pengamatan menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 40x/adekuat menggunakan aplikasi OptiLab. Menggunakan skala rasio.

4.4 Alat dan Bahan Penelitian

4.4.1 Alat

A. Alat Pemeliharaan Tikus

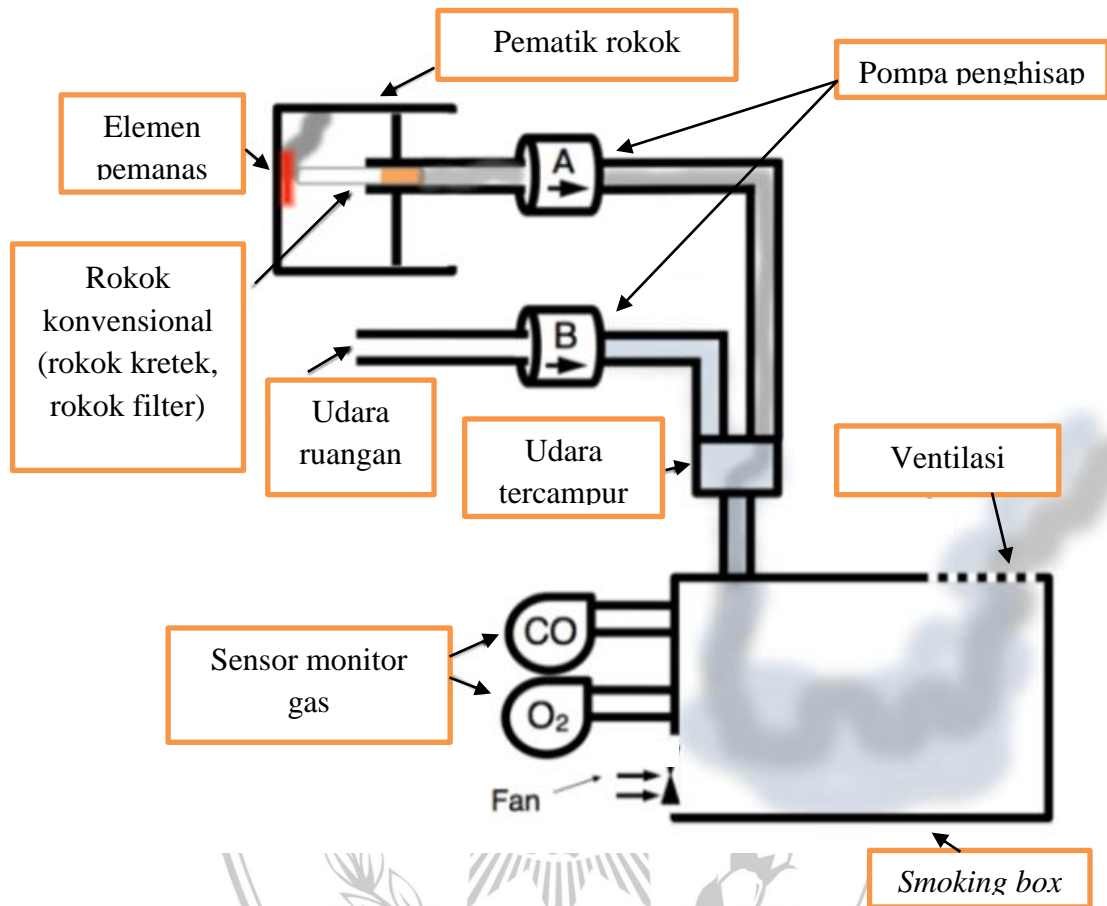
- 1) Kandang Pemeliharaan 10
- 2) Kandang tertutup untuk pengasapan (ukuran 50 x 35 x 20 cm dengan ventilasi berukuran 20 x 10cm)
- 3) Tutup Kandang
- 4) Tempat Minum
- 5) Tempat Makan

B. Alat Pemberian Perlakuan

- 1) Sonde
- 2) Handscoon
- 3) *Smoking pump*

Untuk pemaparan asap rokok digunakan smoking pump buatan Laboran terpadu FK UMM. Alat ini terbuat dari bahan fiber glass yang terbagi menjadi 3 kotak ukuran 26 x 12 x 12 cm. Dalam kotak tersebut diberikan pipa selang dari plastik dengan dua selang, dimana selang pertama berfungsi sebagai tempat pembakaran rokok

dan selang berikutnya berfungsi mengalirkan asap rokok yang dipompa secara manual.



Gambar 4.1 Sketsa Smoking Pump

C. Alat Pembedahan Tikus

- 1) Jas Laboratorium
- 2) Minor Set
- 3) Papan Bedah
- 4) Jarum Pentul
- 5) Handscoon

6) Tabung Pembius Tikus

D. Alat Pengambilan Preparat

1) Minor Set

2) Tabung Film untuk Pengawetan Organ Sementara

3) Handscoon

4) *Cover Glass*

5) *Object Glass*

E. Alat lainnya

1) Kamera

2) Kapas

3) Timbangan

4) Mikroskop

5) Mikrotom

6) Label

7) Termometer Ruangan

4.4.2 Bahan

A. Bahan Pakan Tikus

- 1) Bahan pakan (BR-1): Air 12%; protein kasar 20-22%; lemak kasar $\geq 5\%$; abu $\leq 7,5\%$; Ca 0,9-1,2%; P 0,6-0,8%; coccidiostat positif; antibiotika positif.

- 2) Aquadest

B. Bahan untuk Pemberian Perlakuan

- 1) Ekstrak kulit buah Naga Merah (*Hylocereus polyrhizus*).
(Ethanol 80%)

- 2) Rokok kretek

Rokok yang digunakan adalah rokok kretek non filter.
Jumlah rokok yang diperlukan secara keseluruhan = 21 hari x 4 batang x 4 kelompok = 336 batang

- 3) Aquades

C. Bahan Pembedahan Tikus

- 1) Kloroform

- 2) Aquadest

- 3) NS

D. Bahan Pembuatan Preparat

- 1) *Hematoxylin*

- 2) *Eosin*

3) Alkohol 30%, 50%, 70%, 85%, 95%

4) Formalin 10%

5) Parafin

6) Etanol 80%

7) *Poly-L-lysinea*

8) *Xilol*

4.5 Prosedur Penelitian

4.5.1 Tahap Aklimatisasi dan Pengelompokna Tikus

1) Tahap aklimatisasi

- a. Menimbang berat tikus
- b. Memasukan tikus ke dalam kandang yang terbuat dari bahan yang mudah untuk dibongkar pasang, yaitu dari bak plastik yang ditutup dengan sebuah kawat. Hal ini bertujuan supaya tikus terlihat dari luar kandang, sehingga lebih mudah mengamati tikus dan lebih mudah dalam mengambilnya karena kandangnya dapat dibuka dan di tutup dengan mudah. Di dalam kandang di beri sekam untuk alas si tikus yang di ganti dalam 3-4 hari agar kandang atau alasnya kotor dan bau. Kandang yang dipersiapkan untuk tikus sebanyak 25 tempat. Cara memasukkannya tikus dalam kandang dengan cara memegang

bagian badan tikus dan memasukan satu persatu tikus kedalam kandang agar tikus tidak merasa dalam bahaya atau ketakutan dan stress karena apabila tikus merasa bahaya atau takut dan stress maka akan mempengaruhi dari sistem hormon si tikus.

- c. Tikus di adaptasikan di kandang selama 7 hari yang bertujuan supaya tikus menyesuaikan diri terhadap lingkungan yang baru (Arts, 2012). Selama masa ini tikus diberi pakan BR-1, makanan yang diberikan pada tikus sebanyak (15gram/KgBB/hari), jika terdapat sisa di tempatnya, maka makanan sisa tersebut di buang dan ganti yang baru, dan diberi minum Aquadest.

2) Tahap Pengelompokan Tikus

- a. Tikus yang sudah melewati tahap aklimatisasi yang sudah ditentukan selama 7 hari, maka tikus akan dikelompokkan ke dalam kelompok-kelompok perlakuan yang sudah di siapkan, dan pengelompokannya dilakukan secara acak. Disetiap kandang di isi tikus sebanyak 1 ekor sebanyak 25 kandang dan banyak kandang yang dipergunakan sebanyak 25, setelah itu maka kandang-kandang diberi label sesuai dengan perlakuan I, perlakuan II, Perlakuan III, Kontrol Positif, dan Kontrol Negatif. Dan pembagian perkelompokan pada tikus berdasarkan atas :

- 1) Tikus Putih Jantan (*Rattus norvegicus strain wistar*)
diberik paparan asap rokok 4x/hari + Ekstrak kulit buah
Naga Merah (*Hylocereus polyrhizus*) 100 mg/200g BB
(Perlakuan I)
- 2) Tikus Putih Jantan (*Rattus norvegicus strain wistar*)
diberik paparan asap rokok 4x/hari + Ekstrak kulit buah
Naga Merah (*Hylocereus polyrhizus*) 200 mg/200g BB
(Perlakuan II)
- 3) Tikus Putih Jantan (*Rattus norvegicus strain wistar*)
diberik paparan asap rokok 4x/hari + Ekstrak kulit buah
Naga Merah (*Hylocereus polyrhizus*) 400 mg/200g BB
(Perlakuan III)
- 4) Tikus Putih Jantan (*Rattus norvegicus strain wistar*)
diberik paparan asap rokok 4x/hari tanpa Ekstrak kulit
buah Naga Merah (*Hylocereus polyrhizus*) (Kontrol Positif)
- 5) Tikus Putih Jantan (*Rattus norvegicus strain wistar*)
tanpa paparan asap rokok dan Ekstrak kulit buah Naga
Merah (*Hylocereus polyrhizus*) (Kontrol Negatif)

4.5.2 Pembuatan ekstrak kulit buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*)

- a) Memotong kulit buah naga merah tipis-tipis agar mempercepat proses pengeringan, dikeringkan ditempat yang teduh, dengan suhu udara 25-30°C
- b) Menggiling kulit buah naga merah yang telah kering hingga berbentuk serbuk.
- c) Serbuk ditimbang sebanyak 1 kg selanjutnya dimasukkan ke dalam wadah maserasi. Pelarut ethanol 96% ditambahkan hingga semua serbuk terendam selama 24 jam pada suhu 5°C dan sekurang kurangnya 3 kali ekstraksi, sampai filtrat yang dikeringkan bening.
- d) Filtrat yang didapat dipekatkan dengan menggunakan *rotatory evaporator* selama ± 1 jam dan dilanjutkan dengan menggunakan *waterbath* pada suhu 60°C yang dijaga konstan sampai didapatkan bobot konstan, sehingga diperoleh ekstrak kulit buah naga etanol.
- e) Menimbang ekstrak kulit buah naga sebanyak dosis yang diperlukan yaitu 10mg/200gbb/hari, 20mg/200gbb/hari, 40mg/200gbb/hari pemberian dilakukan 1x sehari.

4.5.3 Penentuan dosis ekstrak kulit buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*)

Dasar penghitungan dosis ekstrak kulit buah naga merah adalah penelitian terdahulu tentang ekstrak Kulit buah naga putih

berpengaruh terhadap gambaran mikroskopis paru mencit yang dipapar asap obat nyamuk bakar dan terbukti mengurangi jumlah infiltrasi sel radang mencit yang dipapar asap obat nyamuk bakar pada dosis efektif 30 mg/20 gBB (Marlina dan Armalina, 2016). Sehingga untuk penelitian ini akan menggunakan dosis yang sudah dikonversi menggunakan perhitungan rumus Laurance & Bacharach : 200 mg/ 200gBB. Berdasarkan hasil penelitian tersebut, peneliti ingin mengetahui jika pemberian dosis ekstrak kulit buah naga yang lebih kecil maupun yang lebih besar dari 200 mg/200 gBB. Peneliti dalam menentukan dosis menggunakan rumus deret hitung sebagai berikut :

- 1) Dosis I $= 1/2 \times N = 100 \text{ mg} / 200 \text{ gBB}$
- 2) Dosis II $= N = 200 \text{ mg} / 200 \text{ gBB}$
- 3) Dosis III $= 2 \times N = 400 \text{ mg} / 200 \text{ gBB}$

4.5.4 Paparan asap rokok

Setiap paparan asap rokok menggunakan *smoking pump*. Semua kelompok yang dipapar dengan asap rokok kretek dengan kadar nikotin 39 mg dan kadar tar 2,3 mg, sebanyak 4 batang x 15 menit setiap hari selama 21 hari.

Cara paparan:

1. Tempat paparan adalah kotak kaca yang berukuran (42x26x19cm).

2. 1 kelompok tikus harus ditaruh di dalam 1 kotak kaca kemudian ditutup.
3. Kemudian memasang Rokok kretek pada pipa bagian ujung.
4. Apabila hendak ingin melakukan pemaparan maka pompa dijalankan kemudian dibiarkan selama 1 jam, setelah 1 jam selesai maka penutup kotak dibuka dan tikus dikeluarkan.
5. Apabila hendak melakukan pemaparan asap rokok, maka kotak kaca beserta *smoking pump* harus dalam keadaan bersih.
6. Pemaparan dilakukan 1 kali sehari pada pukul 15.00 WIB.
7. Setiap pemaparan asap rokok, kotak kaca dan *smoking pump* dibersihkan terlebih dahulu dari sisa asap rokok sebelumnya.

4.6 Pelaksanaan Perlakuan Penelitian

- 1) Pada hari 8 setelah adaptasi tikus, untuk pemaparan asap rokok menggunakan *smoking pump*. Semua kelompok yang dipapar dengan asap rokok kretek dengan kadar nikotin 39mg dan kadar tar 2,3 mg, 4 batang x 15 menit setiap hari selama 21 hari kecuali untuk kelompok kontrol negatif.
- 2) Setelah tikus dipapar rokok, maka selanjutnya diberikan ekstrak kulit buah Naga Merah (*Hylocereus polyrhizus*) selama 21 hari (Hari 8 sampai 28) dengan dosis sesuai perlakuan :
 - a. Pemaparan asap rokok 4x/hari, 1 batang rokok selama 15 menit (Kontrol Positif).

- b. Pemaparan asap rokok 4x/hari, 1 batang rokok selama 15 menit dan diberikan ekstrak kulit buah naga merah dosis 100mg/200 gBB tikus/hari (Perlakuan I).
 - c. Pemaparan asap rokok 4x/hari, 1 batang rokok selama 15 menit dan diberikan ekstrak kulit buah naga merah dosis 200mg/200gBB tikus/hari (Perlakuan II).
 - d. Pemaparan asap rokok 4x/hari, 1 batang rokok selama 15 menit dan diberikan ekstrak kulit buah naga merah dosis 400mg/200gBB tikus/hari (Perlakuan III).
- 3) Peneliti mengambil tikus yang sudah dikelompokkan satu persatu secara hati-hati dan pelan-pelan sehingga tikus tidak merasa takut dan stress, setelah tikus dipegang dengan cara memegang badan tikus dan menaruh bagian ekor serta menjepitnya pada jari antara kelingking dan jari manis, lalu menyilangkan kaki bagian depan tikus dan menjepitnya dengan jari antara jari telunjuk dan jari tengah, sedangkan posisi kepala agak ditengadahkan sehingga membuat tikus dalam posisi siap untuk diberi sonde.

4.7 Pengukuran Berat Badan

Agar mendapatkan nilai perbandingan berat badan tikus sebelum pemberian ekstrak, dilakukan pengukuran berat badan pada tikus untuk menentukan jumlah dosis berat badan harus diukur dan selanjutnya diberikan ekstrak.

4.8 Tahap Pembedahan dan Pembuatan Preparat

A. Tahap Anestesi

- 1) Tikus dibius menggunakan eter hingga tikus dipastikan dipastikan mati.
- 2) Thoraks tikus dibedah dan diambil bagian trakeanya.
- 3) Dilakukan pengambilan organ trakea.
- 4) Irisan trakhea diletakkan pada tabung organ dan difiksasi dengan formalin 10%.
- 5) Kemudian tikus dijahit kembali dan segera dikubur dengan layak.

B. Tahap Pembuatan Preparat Histologi

- 1) Tahap pertama adalah *coating*. Dimulai dengan menandai objek glass yang akan digunakan dengan kikir kaca pada area tepi lalu Irisan trakhea diletakkan pada tabung organ dan difiksasi dengan formalin 10% selama 1 hari
- 2) Dilakukan dehidrasi dengan merendam pada alkohol bertingkat, yaitu konsentrasi 30%, 50%, 70%, 85%, 95% dan 2 kali alkohol absolut masing-masing selama 30 menit.
- 3) Dilakukan clearing dengan menggunakan alkohol dan xilol 2 kali selama 1 jam dengan perbandingan alkohol : xilol (3:1,

1:1, 1:3) dan 2 kali xilol murni masing-masing selama 60 menit.

- 4) Dilakukan proses infiltrasi dengan xilol dan parafin dengan perbandingan xilol : parafin 3:1, 1:1, 1:3 dan 2 kali xilol murni masing-masing selama 24 jam pada suhu 46°C - 52 °C.
- 5) Dilakukan blocking dengan parafin keras pada suhu 46°C - 52°C selama 60 menit.
- 6) Kemudian dipotong dengan mikrotom yang berukuran 3-3 mili mikron dan potongan direkatkan pada kaca obyek
- 7) Dipanaskan pada suhu 46°C - 52 °C didalam inkubator selama 24 jam.
- 8) Dilakukan deparafinisasi yaitu dengan perendaman dengan xilol 2 kali alkohol absolut 95%, 85%, 70%, 50%, 30% dan H₂O masing-masing selama 3 menit.
- 9) Dilakukan pewarnaan Hematoxilin Eosin dengan langkah-langkah sebagai berikut :
 - a. Pemberian Hematoxilin selama 15 detik.
 - b. Eosin dtaining selama 15-20 menit.
 - c. Dehidrasi pada alkohol bertingkat 50%, 70%, 85%, 95% dan 2 kali alkohol absolute.

- d. Pemberian xilol selama 5 menit.
- e. Mounting menggunakan perekat entelan.
- f. Panaskan pada suhu 46°C - 52°C di dalam inkubator selama 24 jam.
- g. Diamati pada mikroskop.

4.9 Pengamatan dan Perhitungan Diameter Lumen Trakea yang mengalami Penyempitan

Mengamati dan mencatat hasil diameter lumen trakea tikus putih jantan (*Rattus norvegicus strain wistar*). Pengamatan menggunakan pemeriksaan mikroskopis terhadap Trakea tikus putih jantan (*Rattus norvegicus strain wistar*) setelah diberi perlakuan selama 21 hari, yang diamati adalah pada penyempitan diameter lumen trakea dalam lapang pandang dengan menggunakan mikroskop cahaya perbesaran 400x / adekuat, kemudian dihitung dan dibandingkan antar kelompok perlakuan.

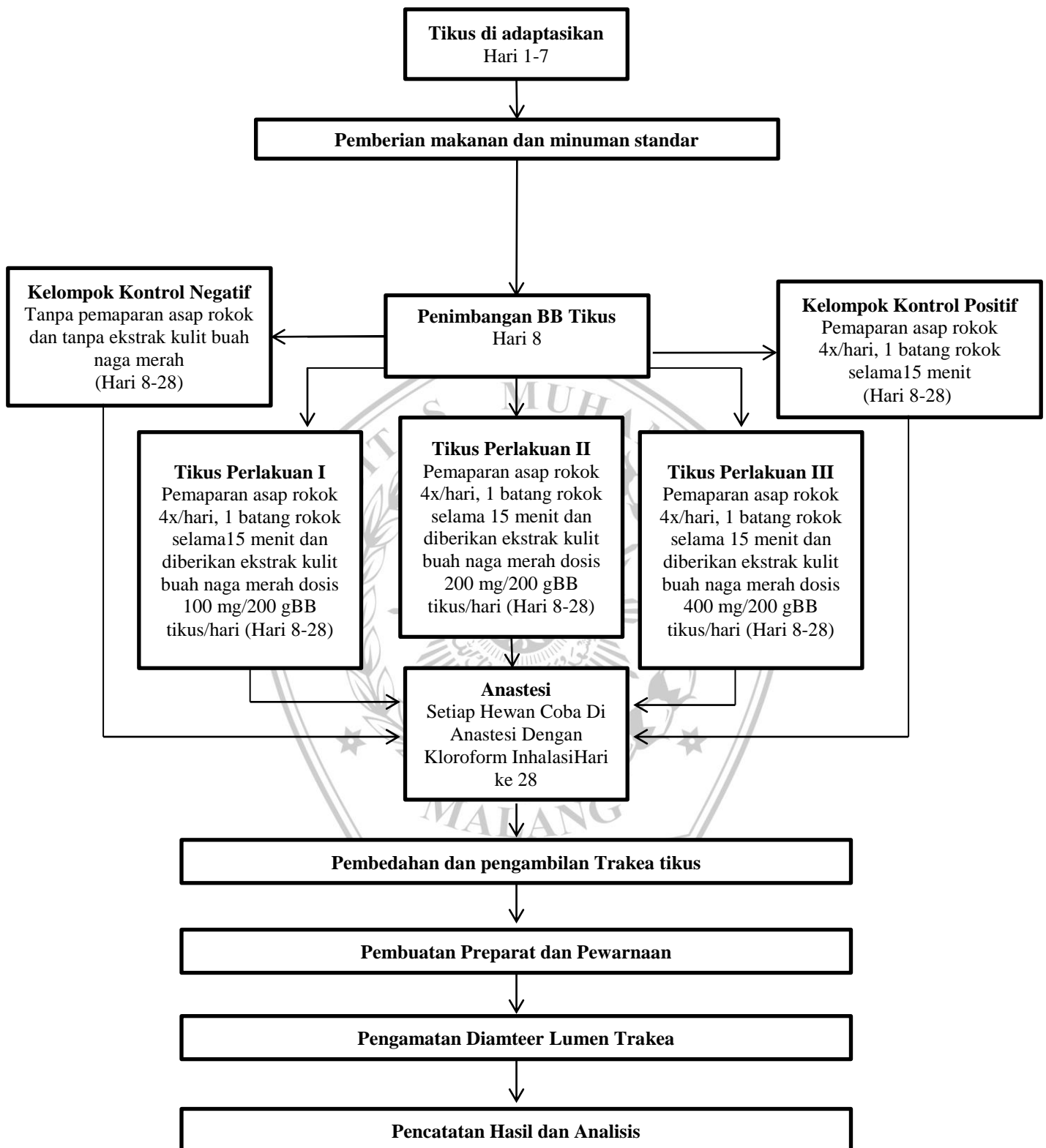
4.10 Penanganan Hewan Coba Setelah Pembedahan

Setelah hewan coba dibedah dan diambil trakeanya, harus dipastikan bahwa hewan coba tersebut tidak mengalami recovery, sebelum mengubur, hewan coba harus dipastikan bahwa denyut nadi hewan coba sudah berhenti, jika hewan coba mengalami recovery, maka harus dilakukan prosedur euthanasia, salah satunya adalah prosedur Cervical Dislocation, yaitu dengan cara memisahkan tengkorak dan vertebrae (SEPA, 2009).

Teknik ini dilakukan dengan memberikan tekanan pada bagian posterior dasar tulang tengkorak dan vertebrae, bila vertebrae terpisah dari otak, reflek kedip akan menghilang, rasa nyeri akan menghilang sehingga hewan tersebut tidak merasakan sakit, selanjutnya hewan coba yang sudah dipastikan mati, dikumpulkan menjadi satu dibungkus polibag dan dikubur sedalam 1m dan jarak minimal 250 m dari sumber air (INSA, 2000).



4.11 Alur Penelitian



Gambar 4.2
Skema Penelitian

4.12 Analisis Data

Penelitian ini diawali dengan uji normalitas Saphiro-Wilk dan uji homogenitas Levene, apa jika hasilnya data sebaran normal dan varian data sama maka akan digunakan uji One Way Anova dan Uji Regresi Linier Sederhana menggunakan aplikasi SPSS :

❖ Uji Normalitas

Apabila pada hasil uji normalitas tidak terdistribusi normal (Nilai Sig < 0,05) maka dilakukan transformasi data terlebih dulu, jika transformasi data dilakukan tetap gagal maka dilanjutkan dengan uji non-parametrik Kruskal-Wallis.

❖ Uji Homogenitas

Uji homogenitas menghasilkan ragam homogen jika nilai sig < 0,05 dan sebaliknya homogen jika sig > 0,05.

❖ Uji One Way Anova

Uji One Way Anova dilakukan setelah didapatkan sebaran data normal (uji normalitas dengan nilai sig > 0,05) dan varian sama (uji homogenitas dengan nilai sig > 0,05). Uji One Way Anova dilakukan untuk membuktikan adanya perbedaan yang bermakna antar kelompok, hasil uji dikatakan ada perbedaan yang bermakna jika $p < 0,05$.

❖ Uji Post Hoc

Uji post hoc menggunakan Uji Bonferroni apabila ragam homogen (nilai sig > 0,05) dan menggunakan Uji Games Howell apabila ragam tidak homogen (nilai sig < 0,05)

❖ Uji Regresi Linier Sederhana

Uji Regresi Linier Sederhana digunakan untuk mengetahui besar pengaruh variabel bebas terhadap variabel terikat, uji ini dilakukan untuk memprediksi penggunaan dosis (dalam 1 mg) terhadap diameter lumen trakea. Prediksi ini dapat diketahui dari persamaan $Y = a + b X$. Karena dalam penelitian ini hanya diteliti variabel dosis maka untuk mengetahui kontribusi variabel tersebut dalam mempengaruhi diameter lumen trakea dapat diketahui dari adjustif R^2 .